



SUOMI-FINLAND
(FI)

(11) (21) Patentihakemus - Patentansökan 971872

(51) Kv.lk.6 - Int.kl.6

A 23J 1/20, 3/08, 3/34, A 23C 11/00

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag 30.04.1997

(24) Alkupäivä - Löpdag 30.04.1997

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig 31.10.1998

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(71) Hakija - Sökande

1. Valio Oy, Meijeritie 4, 00370 Helsinki, (FI)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Vaarala, Outi, Sysimiehentie 51 A, 00670 Helsinki, (FI)
2. Tossavainen, Olli, Koroistentie 7 A 10, 00280 Helsinki, (FI)
3. Syväoja, Reeva-Liisa, Tonttutyttönenkuja 3 D 21, 02200 Espoo, (FI)
4. Kerojoki, Outi, Isonniitynkkä 7 F 25, 00520 Helsinki, (FI)
5. Harju, Matti Erkki, Harjutie 6 G 2, 03100 Nummela, (FI)
6. Salminen, Kari, Mannerheimintie 60 A 8, 00260 Helsinki, (FI)

(74) Asiamies - Ombud: Kolster Oy Ab, Ise Robertinkatu 23, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Proteiinikoostumus ja sen valmistus ja käyttö sekä sitä sisältävät valmisteet ja näiden valmistus

Proteinsammansättning samt dess framställning och användning samt den innehållande produkter och deras framställning

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksinnön kohtena on oleellisesti insuliiniton proteiinikoostumus, jolle on tunnusomaista että, se on valmistettu poistamalla naudan insuliini lehmänmaidosta peräisin olevasta rasvattomasta proteiinipitoisesta materiaalista, kuten herasta, rasvattomasta maidosta tai kaseiniliuksesta. Lisäksi eksinnön kohtena kyseisen proteiinikoostumuksen valmistus ja käyttö sekä sitä sisältävät valmisteet, kuten oleellisesti insuliinittomat äidinmaidonkorvikkeet ja muut erityisravintovalmisteet, ja näiden valmistus.

Uppfinningen avser en väsentlig insulinfri proteinsammansättning kännetecknad av att den framstälts genom att avlägsna nötinsulinet från ett komjölkbaserat fettfritt proteinhaltigt material, såsom vassla, fettfri mjölk eller kaseinlösning. Vidare avser uppfinningen framställning och användning av nämnda proteinsammansättning samt denna innehållande produkter, såsom väsentlig insulinfria modersmjölkersättningar och andra specialfödoämnen och framställning av dem.

Proteiinikoostumus ja sen valmistus ja käyttö sekä sitä sisältäväät valmisteet ja näiden valmistus

Keksinnön kohteena ovat proteiinikoostumus ja sen valmistus ja käyttö sekä sitä sisältäväät valmisteet ja näiden valmistus. Erityisesti eksinnön kohteena ovat oleellisesti insuliiniton proteiinikoostumus ja sen valmistus ja käyttö sekä sitä sisältäväät valmisteet, kuten oleellisesti insuliinittomat äidinmaidonkorvikkeet ja muut erityisravintovalmisteet, ja näiden valmistus.

Nuoruusiän diabetes eli insuliininpuutoksesta johtuva diabetes mellitus (IDDM) on sairaus, jossa haiman Langerhansin saarekkeiden insuliinia tuottavat beeta-solut ovat tuhoutuneet, mutta saarekkeiden muut solut säilyvät vahingoittumattomina. Kyseinen sairaus puhkeaa yleensä viimeistään lapsuusiässä.

Lukuisista lääketieteellisistä tutkimuksista huolimatta ei vielä tarkasti tiedetä, mitkä tekijät aiheuttavat nuoruusiän diabeteksen puhkeamisen. Tällä hetkellä kuitenkin uskotaan, että lasten riskiin sairastua nuoruusiän diabetekseen vaikuttavat sekä perintötekijät että ympäristötekijät, kuten ravinto.

Useissa epidemiologisissa tutkimuksissa on mm. todettu, että altistuminen lehmänmaidon proteiineille imenväisaikana lisää riskiä sairastua nuoruusiän diabetekseen (Gerstein, Diabetes Care 17 (1994) 13 - 19). Epidemiologisten havaintojen perusteella on esitetty useita hypotheseja mekanismeista, miten lehmän maidon proteiinit voisivat toimia diabetogenisinä tekijöinä. On todettu, että immuunivaste naudan seerumialbumiinia (Karjalainen et al., N. Engl. J. Med. 327 (1992) 302-307), beeta-laktoglobulinia (Vaarala et al., Diabetes 45 (1996) 178-182) tai beeta-kaseiinia (Cavallo et al., Lancet 348 (1996) 926-28) kohtaan voisi johtaa beeta-solureaktiivisuuteen, mutta tähän mennessä naudan insuliinin ei ole edes epäilty olevan diabetogeninen riskitekijää.

Lehmänmaidon tiedetään normaalista sisältävän pieniä määriä naudan insuliinia. Kirjallisuudessa ilmoitettu maidon insuliinipitoisuus vaihtelee määritysmenetelmästä riippuen, mutta esimerkiksi ELISA-menetelmällä on todettu 5 noin 50 ng/ml pitoisuksia. Maidon insuliinipitoisuus on suurimmillaan (noin 330 ng/ml) heti poikimisen jälkeen, minkä jälkeen pitoisuus alenee saavuttaen vakiotason (noin 46 ng/ml) noin 7 päivän kuluttua poikimisesta (Aranda et al., J. Dairy Sci. 74 (12) (1991) 4320 - 4325).

10 Hakija on tutkimuksissaan todennut, että tavanomaisen lehmänmaitopohjaisen äidinmaidonkorvikkeen antaminen imeväisikäisille saa aikaan vasta-aineiden, kuten insuliinivasta-aineiden, tuotannon naudan insuliinia kohtaan. Tavanomaista lehmänmaitopohjaista äidinmaidonkorviketta 15 [®] (Enfamil) lisäruokintana saaneiden 6 kuukauden ikäisten lasten ja toisaalta yksinomaan rintamaitoa saaneiden samikäisten lasten IgG-luokan vasta-aineepitoisuudet naudan insuliinia kohtaan on esitetty kuvassa 1. Nämä vasta-aineet ristireagoivat humaani-insuliinin kanssa.

20 Koska insuliiniautovasta-aineiden (IAA):n esiintyminen edeltää ja ennustaa IDDM:n puhkeamista, immunisoituminen naudan insuliinille lehmänmaitopohjaisista tuotteesta voi olla haitallista ja lisätä riskiä sairastua IDDM:ään. Tästä syystä on tarve saada markkinoille lehmänmaitotuotteita ja lehmänmaitopohjaisia tuotteita, jotka eivät sisällä immunoreaktiivista naudan insuliinia.

30 Insuliinin puhdistuksessa tuotanto- ja uuttoliuoksiesta on perinteisesti käytetty nestekromatografiaa ja käänteisfaasikolonnia (Kroeff et al., J. Chromatogr. 461 (1989) 45 - 61; Poll et al., J. Chromatogr. 539 (1991) 37 - 45; Cox, J. Chromatogr. 599 (1992) 195 - 203; Welinder, J. Chromatogr. 542 (1991) 83 - 99), geelisuodatus- tai anioninvaihtokolonnia (WO 90/00176 ja WO 90/00177) tai heikkoa kationinvaihtokolonnia (DE 3511270 A1 ja GB 35 2173503 A). Käänteisfaasi- tai geelisudatuskromatografia

eivät sellaisenaan sovi maidon käsittelyyn, koska käsittelystä maidon tulisi olla elintarvikekelpoista ja kohtuullisen hintaista.

5 Missään hakijan tuntemassa tunnetun tekniikan mukaisessa julkaisussa ei kuitenkaan ole esitetty eikä edes ehdotettu lehmänmaidossa läsnäolevan naudan insuliinin eristämistä tai poistamista.

10 Hakija on nyt keksinyt, miten lehmänmaidosta saadaan kohtuullisin kustannuksin elintarvikekelpoinen proteiinikoostumus, joka on oleellisesti naudaninsuliiniton ja joka sellaisenaan sopii erityisesti äidinmaidonkorvikkeen, mutta myös muiden erityisravintovalmisteiden proteiiniosaksi.

15 Keksinnön kohteena on siten oleellisesti insuliiniton proteiinikoostumus, jolle on tunnusomaista, että se on valmistettu lehmänmaidosta peräisin olevasta rasvattonasta proteiinipitoisesta materiaalista, kuten herasta, rasvattomasta maidosta tai kaseiiniliuoksesta.

20 Kun maidosta poistetaan rasva ja kaseiini, saadaan hera, joka sisältää heraproteiinit. Maidon kokonaisproteiinista noin 20 prosenttia on heraproteiineja ja loput kaseiinia. Juustonvalmistuksen yhteydessä saatavaa heraa kutsutaan juustoheraksi ja kaseiininvalmistuksen yhteydessä saatavaa heraa puolestaan kutsutaan kaseiiniheraksi.

25 Keksinnössä käytettävä hera voi olla mikä tahansa lehmänmaidosta peräisin oleva hera, kuten esimerkiksi juustohera, juoksetekaseiinihera, happokaseiinihera tai hapan juustohera. Edullisesti hera on juustohera.

30 Heran lisäksi eksinnössä voidaan käyttää lehmänmaidosta peräisin olevana rasvattomana proteiinipitoisena materiaalina rasvatonta maitoa tai rasvattomasta maitojauheesta tehtyä vesiliuosta tai maidon kaseiinista tehtyä vesiliuosta, ts. kaseiiniliuosta.

35 Keksinnön mukainen oleellisesti insuliiniton proteiinikoostumus voidaan sopivasti valmistaa eksinnön mukai-

sella menetelmällä, jolle menetelmälle on tunnusomaista, etä

5 a) lehmänmaidosta peräisin oleva nestemäinen rasvaton proteiinipitoinen materiaali johdetaan insuliinipoistokäsittelyyn,

b) vaiheessa a) saatu nestemäinen proteiinipitoinen materiaali

10 konsentroidaan ultra- ja diasuodattamalla käyttäen kalvoja, jotka ovat 6 000 - 20 000 D cut-off -kalvoja,

saatu proteiinikonsentraatti haihdutetaan ja kuivataan proteiinijauheksi,

c) mahdollisesti

15 1) vaiheessa b) saadusta proteiinikonsentraatista tai proteiinijauheesta muodostetaan veteen liuos, jonka proteiinipitoisuus on 1 - 20 %,

2) vaiheessa c1) saatu proteiiniliuos hydrolysoidaan entsymaattisesti proteaaseilla ja

3) vaiheessa c2) hydrolysoitu proteiiniliuos ultrasuodatetaan, ja

20 d) mahdollisesti johdetaan vaiheessa c) saatu proteiinihydrolysaatti hydrofobiseen kromatografiakäsittelyyn ja

e) vaiheessa c) tai d) saatu liuos haihdutetaan ja kuivataan jauheksi.

25 Vaiheessa a) lehmänmaidosta peräisin oleva nestemäinen rasvaton proteiinipitoinen materiaali johdetaan insuliinipoistokäsittelyyn, jolloin oleellisesti kaikki tai ainakin merkittävä osa kyseisessä materiaalissa ole vasta naudan insuliinista saadaan poistettua. Insuliinipoistossa kyseistä lehmänmaidosta peräisin olevaa nestemäistä materiaalia voidaan käsitellä vahvalla kationinvaihtohartsilla tai se voidaan kirkastaa esimerkiksi mikrosuodattamalla tai sentrifugoimalla. Hera voidaan tässä vaiheessa kirkastaa myös ultrasuodattamalla.

Parhaat insuliinipoistotulokset saadaan kuitenkin silloin kun puhdistettava materiaali ensin kirkastetaan edellä mainitulla tavalla ja sen jälkeen sitä käsitellään vahvalla kationinvaihtohartsilla.

5 Hera, kuten juusto- tai kaseiinihera on edullisinta puhdistaa naudan insuliinista vahvalla kationinvaihtohartsilla. Sopivia kationinvaihtohartseja ovat esimerkiksi Amberlite C-20 (Rohm & Haas, Ranska) ja Spherosil S. (Rhône-Poulenc, Ranska) Puhdistettava hera, jonka pH on laskettu arvoon 5,2 - 5,6 elintarvikelaatuisella hapolla, esimerkiksi HCl:lla, tai ioninvaihdolla, johdetaan 3 - 65 °C:ssa sopivasti huoneenlämpötilassa Na^+ - tai K^+ -muotoon regeneroidulla vahvalla kationinvaihtohartsilla täytetyn pylvään läpi. Panosprosessissa syöttönopeus ja -tilavuus voivat vaihdella, mutta sopivasti syöttönopeus on 1 - 10 pylvääntilavuutta (BV) / h ja syöttötilavuus on 5 - 60 BV, edullisesti 20 BV. pH-alueella 5,2 - 5,6 heran proteiinit ovat yleensä negatiivisesti varautuneita, mutta insuliini on positiivisesti varautunut, sillä sen isoelektrinen pisteen on 5,6 (Erkama, Biokemia, s. 185). Tällöin ainakin oleellinen osa herassa olevasta naudan insuliinista sitoutuu kationinvaihtohartsiin negatiivisesti varautuneiden heraproteiinien mennessä pylvään läpi.

25 Edullisesti hera puhdistetaan naudan insuliinista vahvalla kationinvaihtohartsilla pH:ssa 5,4.

Vahvalla kationinvaihtohartsilla puhdistetussa herassa ei todettu lainkaan naudan insuliinia electro spray -massaspektrometrillä.

30 Myös rasvattoman lehmänmaidon ja maidon kaseiinista tehdyt vesiliuoksen, ts. kaseiiniliuoksen naudaninsuliinipitoisuutta voidaan alentaa merkittävästi vastaavalla käsitellyllä vahvalla kationinvaihtohartsilla. Tällöin kaseiiniliuoksen insuliinipitoisuus alenee ainakin noin 65 % ja rasvattoman maidon insuliinipitoisuus puolestaan alenee ainakin noin 40 %.

Insuliini analysoitiin näytteistä electro spray -massaspektrometrillä (VG Quattro II, VG BioTech, Altrincham, Englanti) käyttäen esikäsittelynä fraktiointia nesterkromatografian (Hewlett Packard HPLC 1090, Hewlett Packard Co. Saksa) C18-käänteisfaasikolonilla (eluentit: A: 0,05 % trifluorietikkahappo (TFA) vedessä, B: asetonitriili (Acn) + 0,05 % TFA, gradientti: 15 % -> 40 % 20 min:ssa, 40 % -> 100 % 10 min:ssa). Insuliinia sisältävä fraktio pakkaskuivattiin, liuotettiin uudelleen konsentroiduksi liuokseksi ja johdettiin massaspektrometriin.

Heraa voidaan puhdistaa naudan insuliinista kirkastamalla hera esimerkiksi mikrosuodattamalla, ultrasuodattamalla tai sentrifugoimalla, jolloin herasta saadaan pois jäännöskaseiini ja muut suurimolekyyliset proteiinit, joihin insuliini hydrofobisena proteiinina on sitoutunut.

Mikrosuodatuksessa puhdistettava hera johdetaan sopivasti 10 - 60 °C:ssa mikrosuodatuskalvojen läpi, jotka kalvot ovat 0,05 - 1,4 mikrometrin kalvoja, edullisesti 0,1 mikrometrin kalvoja.

Ultrasuodatuksessa puhdistettava hera puolestaan käsitellään ultrasuodatuskalvoilla, jotka edullisesti ovat kalvoja, joiden cut-off -arvo on 50 000 - 200 000 Daltonia.

Sentrifugoinnissa heraa käsitellään edullisesti nopeudella 1 000 - 10 000 kierrosta / min.

Kirkastuskäsittely alentaa heran naudaninsuliinipitoisuutta 6 - 10 %.

Kirkastuskäsittely ja kationinvaihtohartsikäsittely alentavat molemmat käsiteltävän, lehmänmaidosta peräisin olevan materiaalin naudan insuliinipitoisuutta, mutta parhaat tulokset saadaan kun kyseinen materiaali ensin kirkastetaan ja sen jälkeen johdetaan kationinvaihtohartsikäsittelyyn. Parhaat tulokset saadaan heran käsitellyssä, jolloin edullisin kirkastusmenettely on mikrosuodatus.

Vaiheessa a) naudan insuliinista puhdistettu proteiinipitoinen materiaali, edullisesti hera konsentroidaan ultra- ja diasuodatukselia riittävän proteiinipitoisuuden aikaansaamiseksi, minkä jälkeen näin saatu proteiinikon-
 5 sentraatti haihdutetaan ja mahdollisesti kuivataan proteiinijauheksi. Tällöin naudan insuliinista ainakin merkit-
 tävästi puhdistettu materiaali, kuten hera, jonka materi-
 aalin pH on säädetty arvoon noin 6,5 elintarvikelaatuise-
 la emäksellä, esimerkiksi NaOH:lla tai Ca(OH)₂:lla, tai io-
 10 ninvaihdolla, johdetaan ultra- ja diasuodatuksen, jolloin
 puoliläpäisevän kalvon avulla suurempimolekyyliset
 proteiinit saadaan eroon laktoosista, suoloista ja pienem-
 pimolekyylisistä proteiineista, kuten insuliinista, jonka
 molekyylipaino on noin 5734 D. Puoliläpäisevän kalvon cut
 15 off -arvo on sopivasti 6 000 - 20 000 D, edullisesti
 10 000 D ja puoliläpäisevänä kalvona voidaan käyttää esimerkiksi polyeetterisulfonikalvoa, jonka cut off -arvo on
 10 000 D.

Vaiheessa a) saatu hera voidaan konsentroida koko-
 20 naiskonsentrointisuhteella, joka sopivasti on noin 120. Tällöin vaiheessa a) käsitelty hera ultrasuodatetaan edullisesti 10 000 D cut off -kalvoilla ensin esimerkiksi kon-
 sentrointisuhteella 10, minkä jälkeen retentaatti laimen-
 netaan lähtötilavuuteen ja suodatetaan uudelleen suhteella
 25 12, jolloin kokonaiskonsentrointisuhteeksi tulee 120. Näin saatu heraproteiinikonsentraatti, jonka proteiinipitoisuus on noin 90 % kuiva-aineesta, haihdutetaan ja kuivataan jauheksi esimerkiksi sumutuskuivauksella tai pakkas-
 kuivauksella.

Perinteisesti ultra- ja diasuodatettu heraproteiinijauhe, jonka proteiinipitoisuus on 70 - 80 %, sisältää 43 - 48 mikrogrammaa insuliinia / gramma jauhetta (noin 60 mikrogrammaa insuliinia / gramma proteiinia).

Sitä vastoin keksinnön mukaisen menetelmän vaihei-
 35 den a) ja b) mukaisesti saatu heraproteiinijauhe sisältää

merkittävästi vähemmin naudan insuliinia kuin edellä mainittu perinteisesti ultra- ja diasuodatettu heraproteiinijauhe. Vahvalla kationinvaihtohartsilla vaiheessa a) naudan insuliinista puhdistetusta herasta valmistetussa heraproteiinijauheessa ei todettu lainkaan naudan insuliinia electro spray -massaspektrometrillä. Näin saatu oleellisesti insuliiniton proteiinikocustumus sopii sellaisenaankin esimerkiksi äidinmaidonkorvikkeiden ja muiden erityisravintovalmisteiden raaka-aineeksi, koska sen sisältämä heraproteiini on ravitsemuksellisesti erittäin korkealaatuista eikä tarvitse muita proteiineja ravinnotisälllyksen täydentämiseksi.

Kationinvaihtohartsikäsittely voidaan tehdä myös esimerkiksi rasvattomalle maidolle tai vesiliuoksenä olevalle maidon kaseiinille, joka on edullinen proteiinivalmiste. Naudaninsuliinijäämä voidaan poistaa kaseiiniliuoksesta vastaavalla tavalla kuin maidosta. Heraproteiinia heikomman ravintoarvonsa vuoksi kaseiini ei kuitenkaan ole yhtä suositeltavaa äidinmaidonkorvikkeen yksinomaiseksi proteiinilähteeksi kuin heraproteiini.

Mikäli keksinnön mukaisen proteiinikooostumuksen naudaninsuliinipitoisuutta halutaan vielä alentaa, voidaan sen valmistukseen liittää entsymaattinen hydrolyysi ja mahdollisesti vielä hydrofobinen kromatografiakäsittely. Tällöin vaiheessa b) saadusta proteiinikonsentraatista tai proteiinijauheesta muodostetaan veteen liuos, jonka pitoisuus on 1 - 20 %, edullisesti noin 5 %. Liuoksen pH säädetään arvoon noin 8,5 esimerkiksi Ca(OH)_2 :lla ja lämpötila noin arvoon 50 °C, minkä jälkeen liuokseen lisätään eläintai mikrobiperäisiä entsyyymejä, siten, että ne hydrolysoivat tehokkaasti erityisesti naudan insuliinin proteiiniketjun sidoksia. Tällaisia proteaaseja ovat mm. kymotrypsiini, subtilisiini Carlsberg -seriiniproteaasi, subtilisiini BPN' -seriiniproteaasi, *Aspergillus oryzae*an serini- ja metalloproteaasit, papaiini, *Bacillus subtilis*

5 -neutraaliproteaasi, termolysiini, *Streptomyces griseuksen* seriini- ja metalloproteaasit, pepsiini, *Endothica parasitica* hapanproteaasi ja pankreatiini. Hydrolyysin annetaan jatkua 8 tunnin ajan. Hydrolyysisä naudan insuliini pilkkoutuu korkeintaan viiden aminohapon pituisiksi peptideiksi, jotka eivät aiheuta immuunivastetta eivätkä sisällä aiemman insuliininmolekyylin sisältämiä epitopeja. Nämä saatu hydrolyysisä johdetaan pilkkoutumattomien 10 suurikokoisten molekyylien poistamiseksi ultrasuodatuksen tiheän ultrasuodatuskalvon läpi, joka sopivasti on 2 000 D cut-off -kalvo. Saatu permeaatti kuivataan esimerkiksi sumutuskuivauksella jauheeksi. Saadussa tuotteessa ei ole todettavissa naudan insuliinia.

15 Jos naudan insuliinin hydrolyysituotteet halutaan poistaa seoksesta mahdollisimman tarkasti, voidaan edellä saatu heraproteiinihydrolysaatti johtaa sopivasti 10 % liuoksesta hydrofobiseen kromatografiakäsittelyyn, joka poistaa hydrolysaatista hydrofobiset peptidit ja niiden mukana mahdolliset naudan insuliinin hydrolyysituotteet.

20 Kyseinen kromatografiakäsittely voidaan tehdä sopivasti hydrofobisella adsorptiohartsilla, kuten Amberlite XAD-16 -hartsilla (Rohm & Haas, Ranska), mutta se voidaan tehdä myös aktiivihiilellä, joka myös pystyy poistamaan hydrofobisia yhdisteitä. Tuotantomittakaavassa kyseinen kromatografiakäsittely voidaan tehdä käytännöllisesti pylvässä, jonka pakatun adsorptiohartsin tai aktiivihiilen läpi käsiteltävä liuos johdetaan. Pylvään läpi tullut liuos otetaan talteen, haihdutetaan ja kuivataan jauheeksi. Nämä saatu jauhe ei sisällä nykymenetelmillä havaittavia määriä naudan insuliinia. Tuotteen aminohappokoostumus on kuitenkin muuttunut jonkin verran hydrofobisten aminohappojen kohdalla, joten pieni määriä fenyylialaniinia ja tyrosiinia joudutaan lisäämään ravintovalmisteiden valmistukseen yhteydessä.

5 Edullisimmin naudan insuliini poistetaan lehmämaidosta peräisin olevasta rasvattomasta proteiinipitoisesta materiaalista, edullisesti herasta vahvalla kationinvaihtohartsilla, minkä jälkeen näin käsitetty neste-
10 mäinen proteiinipitoinen materiaali konsentroidaan ultra- ja diasuodatuksella. Mikrosuodatus esikäsittelynä on edullista, koska insuliini on usein tarttuneena makromolekyy-
15 leihin, kuten kaseiinipölyyn tai denaturoituneeseen heraproteiiniin, jotka voidaan poistaa sopivasti mikrosuoda- tuksen avulla. Mikäli em. menetelmillä ei ole saavutettu tuotteen riittävän alhaista naudaninsuliinipitoisuutta, sitä on mahdollista alentaa edelleen entsymaattisen hydro-
20 lyysin ja siihen mahdollisesti liitettävän hydrofobisen kromatografian avulla.

15 Äidinmaidonkorvikkeet koostetaan perinteisesti mai- dosta, kermasta, kasviöljystä, vähäsuolaisesta hera- jauheesta, kivennäisistä ja vitamiineista, joista maito, kerma ja vähäsuolainen herajauhe sisältävät naudan insu- liinia. Heraproteiini on ravintoarvoltaan hyvin kor- kealuokkaista, joten se soveltuu ainoaksi proteiiniläh- teeksi äidinmaidonkorvikkeeseen ja muihinkin erityisravin- tovalmisteisiin.

25 Keksinnön mukaista oleellisesti insuliinitonta proteiinikoostumusta voidaan käyttää äidinmaidonkorvikkeen ja muidenkin erityisravintovalmisteiden proteiiniosana sekä esimerkiksi kulutusmaidon raaka-aineena. Tällöin saadaan valmiste, joka ei sisällä naudan insuliinia, joten se ei myöskään aiheuta immunisoitumista naudan insuliinille eikä siten lisää riskiä sairastua IDDM:ään.

30 Keksinnön kohteena on siten myös oleellisesti insu- liiniton äidinmaidonkorvike samoin kuin oleellisesti insu- liiniton erityisravintovalmiste, joille on tunnusomaista, että niiden oleellisesti insuliiniton proteiiniosa on val- mistettu lehmänmaidosta peräisin olevasta rasvattomasta proteiinipitoisesta materiaalista, kuten herasta, rasvat-
35

tomasta maidosta tai kaseiiniliuoksesta, edullisesti kuitenkin herasta, sopivasti edellä kuvatulla tavalla.

Keksintöä kuvataan lähemmin seuraavissa esimerkeissä.

5 Esimerkki 1

6000 ml:n tuoretta juustoheraa pH laskettiin 10 % HCl:lla 5,4:ään. 300 ml vahvaa kationinvaihtohartsia (Amberlite C-20, Rohm & Haas, Ranska) pakattiin 300 ml:n laboratoriomitän pylvääseen ja regeneroitiin 600 ml:lla 17 % NaCl:a, jonka jälkeen pylväs huuhdottiin 1000 ml:lla vettä. Pylvään läpi ajettiin huoneenlämmössä 6000 ml juustoheraa (20 pylvääntilavuutta (BV)) nopeudella 6 BV/h. Ennen käsittelyä hera sisälsi 343 ng/ml insuliinia eli 68 mg insuliinia/kg todellista proteiinia, käsittelyn jälkeen 10 herasta ei todettu lainkaan insuliinia eli pitoisuus aleni käsittelyssä 100 %. Heran kokonaisproteiinipitoisuus ei muuttunut merkittävästi käsittelyssä. Ennen käsittelyä proteiinipitoisuus oli 0,87 %, käsittelyn jälkeen 0,86 %. pH nostettiin 10 % NaOH:lla uudestaan 6,5:een, jonka jälkeen hera ultrasuodatettiin 10 000 D cut-off -kalvoilla ensin konsentrointisuhteella 10, sitten retentaatti laimennetaan lähtötilavuuteen ja suodatetaan uudelleen suhteella 12, jolloin kokonaiskonsentrointisuhteen tulee 120. Proteiinikonsentraatti pakkakuivattiin 90 % proteiinia sisältäväksi jauheeksi.

15 Esimerkki 2

20 100 litraa 0,1 μm mikrosuodatuskalvojen läpi suodatettua juustoheraa ultrasuodatetaan 10 000 D cut-off -kalvoilla ensin konsentrointisuhteella 10, sitten retentaatti laimennetaan lähtötilavuuteen ja suodatetaan uudelleen suhteella 12, jolloin kokonaiskonsentrointisuhteen tulee 120. Retentaatti sisälsi proteiinia 90 % kuiva-aineesta ja se sumutuskuivattiin jauheeksi (kuivauslämmöt 180/75 °C). Käsittelytöntä juustoheraa sisälsi insuliinia 25 electro spray -massaspektrometrianalyysin mukaan 343 ng/ml

eli 68 mg/kg todellista proteiinia. Mikrosuodatettu hera sisälsi insuliinia 324 ng/ml eli 64 mg/kg todellista proteiinia. Ultra- ja diasuodatetussa heraproteiinikonsentraatissa insuliinipitoisuus oli 21 mg/kg todellista proteiinia massaspektrometrin mukaan eli pitoisuus aleni proteiiniin suhteutettuna n. 69 %. Perinteinen 70 - 80 % proteiinia sisältävä ultrasuodatettu heraproteiinijauhe sisältää insuliinia n. 60 mg/kg todellista proteiinia.

Esimerkki 3

10 100 litraa happokaseiinin valmistuksesta saatua hoppoheraa mikrosuodatettiin vastaavasti 0,1 μ m:n kalvojen läpi. Heran pH oli 4,5. Mikrosuodatettu hera ultra- ja diasuodatettiin vastaavasti kuin esimerkissä 1 siten, että kokonaiskonsentraointisuhteeksi tuli 120. Proteiinipitoisuus oli tällöin noin 90 % kuiva-aineesta. Käsittelymätön hera sisälsi insuliinia 320 ng/ml eli 48 mg/kg todellista proteiinia, mikrosuodatettu 295 ng/ml eli 45 mg/kg todellista proteiinia ja ultra- ja diasuodatetussa heraproteiinikonsentraatissa insuliinia oli 95 ng/ml eli 16 mg/kg todellista proteiinia massaspektrometrin mukaan määritettyä. Siten insuliinipitoisuus aleni käsittelyssä n. 67 %.

Esimerkki 4

25 60 litraan 50-asteista vettä liuotettiin 5,040 kg esimerkissä 1 valmistettua heraproteiinijauhetta, 11,423 kg kasvirasvaseosta, 11,232 kg glukoosia, 12,260 kg malto-dekstriiniä (DE 21), 135 g vitamiini- ja mineraaliesosta (sisältää A-, D-, E-, K-, B1-, B2-, B6-, B12-vitamiinit, niasiinin, foolihapon, pantoteenihapon, biotiinin, askorbiinihapon, koliinin, inositolin, ferroglukonaatin, 30 sinkkisulfaatin, mangaanisulfaatin, natriumseleiniitin, kupariglukonaatin) sekä 70 g kalsiumkloridia, 300 g kalsiumfosfaattia, 65 g magnesiumsulfaattia, 125 g natriumkloridia ja 620 g kaliumsitraattia. Seoksen kuiva-ainepitoisuus oli n. 40 %. Näin saatu seos johdettiin homogenisaattoriin (150/50 bar) ja kuivattiin jauheeksi sumu-
35

tuskuivaimella, jossa kuivauslämmöt olivat 180/75 °C, leijupedillä 70/120/30 °C. Tuote oli koostumukseltaan, ulkonäöltään ja maultaan tavallisen äidinmaidonkorvikejauheen kaltaista.

5 Esimerkki 5

Esimerkissä 1 esitetty heraproteiinikonsentraatti laimennettiin 5 % pitoisuuteen vedellä. Liuos pastöroitiin 65 °C:ssa 20 min ajan ja jäähdytettiin 50 °C:een. pH säädettiin 8,5:een 10 % Ca(OH)₂:lla. Seokseen lisättiin 6 % proteiinin määristä pankreatiini (4 x USP, SPL, USA) - ja Alcalase 0,6 L -entsyymejä (Novo Industri A/S; Tanska). Hydrolyysin aikana seoksen pH:ta pidettiin 7,0:ssa Ca(OH)₂-lisäysten avulla. Seoksen annettiin hydrolysoitua 8 tunnin ajan, jonka jälkeen seos lämpökäsiteltiin 5 min ja 90 °C:ssa. Tämän jälkeen seos jäähdytettiin 50 °C:een ja ultrasuodatettiin 2000 D cut-off -kalvoilla ja permeaatti kerättiin talteen. Saatu permeaatti sumutuskuivattiin jauheksi. Hydrolysaatista ei ollut todettavissa insuliinia.

15 Esimerkki 6

20 Esimerkissä 5 saatu hydrolysaatti liuotettiin 10 % liuokseksi. 30 ml Amberlite XAD-16 -hartsia (Rohm & Haas) pakattiin laboratoriomittakaavaiseen pylvääseen, joka regeneroitiin 60 ml:lla 4 % NaOH, huuhdeltiin 1000 ml:lla vettä ja regeneroitiin 60 ml:lla 4 % HCl:a ja huuhdeltiin vedellä kunnes läpitulleen veden pH oli yli 5. Hydrolysaattiliuosta ajettiin 1700 ml hartsipylvään läpi, mikä vastasi 567 g hydrolysaattikuiva-ainetta/100 ml hartsia. Läpitullut liuos otettiin talteen ja pakkaskuivattiin jauheksi. Hydrolysaatista ei ollut todettavissa insuliinia. 25 Hydrolysaatti käytettiin maitoallergikoille tarkoitettun erityisravintovalmisteen yksinomaisena proteiinilähteenä.

30 Esimerkki 7

35 60 litraan 50-asteista vettä liuotettiin 8,670 kg esimerkin 6 mukaisesti valmistettua heraproteiinihydrolysaattijauhetta, 10,466 kg kasvirasvaseosta, 16,058 kg

glukoosia, 5,233 kg maltodekstriiniä (DE 21), 135 g vitamiini- ja mineraaliesiseosta (sisältää A-, D-, E-, K-, B1-, B2-, B6-, B12-vitamiinit, niasiinin, foolihapon, pantoteenihapon, bictiinin, askorbiinihapon, koliinin, 5 inositolin, ferroglukonaatin, sinkkisulfaatin, mangaanisulfaatin, natriumseleniitin, kupariglukonaatin) sekä 10 g kalsiumkloridia, 320 g kalsiumfosfaattia, 70 g magnesiumsulfaattia, 165 g natriumkloridia ja 620 g kaliumsitraattia, 1 g L-tyrosiinia ja 2 g L-fenyylialaniinia. 10 Seoksen kuiva-aineepitoisuus oli n. 40 %. Näin saatu seos johdettiin homogenisaattoriin (150/50 bar) ja kuivattiin jauheeksi sumutuskuivaimella, jossa kuivauslämmöt olivat 180/75 °C, leijupedillä 70/120/30 °C. Tuote oli kostumuk- 15 seltaan, ulkonäältään ja maultaan tavallisen esim. maito- allergikoille tarkoitettun erityisravintovalmisteen kal- taista.

Esimerkki 8

Vahva kationinvaihtopylväs (30 ml hartsia) regeneroitiin kuten esimerkissä 1. 600 ml:n rasvatonta maitoa pH säädettiin 5,4:ään. pH-säädetty maito ajettiin huoneenlämässä pylvään läpi kuten esimerkissä 1, jolloin maidosta poistui osa kalsiumista, mutta myös huomattava osa insuliinista. RIA-analyysin mukaan (massaspekrometri ei ollut käytettävissä maidolle) käsittelemätön maito sisälsi naudan insuliinia 26 µIU/ml ja käsitelty 17 µIU/ml. 20 Insuliinipitoisuus aleni käsitellyssä n. 35 %. Käsittely ei ollut riittävä insuliinin täydelliseen poistamiseen maidosta, mutta esimerkki kuvaaa, että menetelmä sopii myös 25 muiden maitoraaka-aineiden kuin heran käsitellyyn.

Esimerkki 9

Kationinvaihtohartsi (30 ml) regeneroitiin kuten esimerkissä 1. Natriumkaseinaatista valmistettiin 3 % liuos veteen. pH laskettiin 5,5:een laimealla HCl:lla. Kaseinaattiliuos pumpattiin kationinvaihtohartsin läpi huoneenlämässä kuten maito esimerkissä 8. Ennen käsitellyä 30 35

kaseinaattiliuos sisälsi insuliinia RIA-analyysin mukaan 26 μ IU/ml ja käsitelty liuos 10 μ IU/ml. Insuliinipitoisuus aleni kästtelyssä n. 62 %.

Patenttivaatimukset

1. Oleellisesti insuliiniton proteiinikoostumus, joka on käyttökelpoinen erityisravintovalmisteen proteiiniosana tai kulutusmaidon raaka-aineena, tunnettu siitä, että se on lehmänmaidosta peräisin oleva rasvaton, oleellisesti naudan insuliiniton proteiinipitoisen materiaali, kuten hera, rasvaton maito tai kaseiiniliuos.

10 2. Menetelmä oleellisesti insuliinittona proteiinikoostumuksen valmistamiseksi, tunnettu siitä, että

15 a) lehmänmaidosta peräisin oleva nestemäinen rasvaton proteiinipitoinen materiaali johdetaan insuliininpoistokäsittelyyn, jolloin se mahdollisesti ensin kirkastetaan ja sen jälkeen se johdetaan ph-arvon ollessa 5,2 - 5,6, Na^+ - tai K^+ -muotoon regeneroidulla vahvalla kationinvaihtohartsilla täytetyn pylvään läpi.

20 b) vaiheessa a) saatu nestemäinen proteiinipitoinen materiaali

25 konsentroidaan ultra- ja diasuodattamalla käyttäen kalvoja, jotka ovat 6 000 - 20 000 D cut-off -kalvoja, saatu proteiinikonsentraatti haihdutetaan ja mahdollisesti kuivataan proteiinijauheksi,

c) mahdollisesti

30 1) vaiheessa b) saadusta proteiinikonsentraatista tai proteiinijauheesta muodostetaan veteen liuos, jonka proteiinipitoisuus on 1 - 20 %,

2) vaiheessa c1) saatu proteiiniliuos hydrolysoidaan entsymaattisesti proteaaseilla ja

35 3) vaiheessa c2) hydrolysoitu proteiiniliuos ultrasuodatetaan, ja

d) mahdollisesti johdetaan vaiheessa c) saatu proteiinihydrolysaatti hydrofobiseen kromatografiakäsittelyyn ja

e) vaiheessa c) tai d) saatu liuos haihdutetaan ja kuivataan jauheeksi.

5 3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että vaiheessa a) nestemäisenä rasvattomana proteiinipitoisena materiaalina käytetään heraa, rasvatonta maitoa tai kaseiiniliuosta, edullisesti heraa.

10 4. Patenttivaatimuksen 2 tai 3 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että vaiheessa a) nestemäinen rasvaton proteiinipitoinen materiaali kirkastetaan ennen kationinvaihtohartsikäsittelyä suodattamalla se mikrosuodatuskalvojen läpi, jotka kalvot ovat 0,05 - 1,4 mikrometrin kalvoja, edullisesti 0,1 mikrometrin kalvoja.

15 5. Patenttivaatimuksen 2 tai 3 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että vaiheessa a) nestemäinen rasvaton proteiinipitoinen materiaali kirkastetaan ennen kationinvaihtohartsikäsittelyä käsittelemällä sitä ultrasuodatuskalvoilla, jotka edullisesti ovat 50 000 - 200 000 D cut-off -kalvoja.

20 6. Patenttivaatimuksen 2 tai 3 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että vaiheessa a) nestemäinen rasvaton proteiinipitoinen materiaali kirkastetaan ennen kationinvaihtohartsikäsittelyä sentrifugoimalla se edullisesti nopeudella 1 000 - 10 000 kierrosta / min.

25 7. Jonkin patenttivaatimuksista 2 - 6 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että vaiheessa b) ultra- ja diasuodatuksessa käytettään kalvoja, jotka ovat 10 000 D cut-off -kalvoja.

30 8. Jonkin patenttivaatimuksista 2 - 7 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että vaiheessa b) ultra- ja diasuodatetusta proteiinikonsentraatista muodostetaan vesiliuos, jonka pitoisuus on 1 - 20 %, edullisesti noin 5 %, ja joka hydrolysoidaan entsymaattisesti proteaaseilla, kuten pankreatiini- ja alkalaasientsyymillä.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että vaiheessa c) saatu proteiinihydrolysaatti johdetaan hydrofobiseen kromatografia-5 käsittelyyn, jolloin sitä käsittellään aktiivihiilellä tai edullisesti hydrofobisella polystyreenipohjaisella adsorp-tiohartilla.

10. Patenttivaatimuksen 1 mukaisen tai jonkin patenttivaatimuksista 2 - 9 mukaisella menetelmällä valmis-tetun proteiinikoostumuksen käyttö äidinmaidonkorvikkeen tai jonkin muun erityisravintovalmisteen proteiiniosana tai kulutusmaidon raaka-aineena.

11. Oleellisesti insuliiniton äidinmaidonkorvike, tunnettu siitä, että sen proteiiniosa on oleelli-15 sesti naudaninsuliiniton, lehmänmaidosta peräisin cleva rasvaton proteiinipitoinen materiaali, kuten hera, rasva-ton maito tai kaseininiliuos, edullisesti hera.

20. Oleellisesti insuliiniton erityisravintovalmiste, tunnettu siitä, että sen proteiiniosa on oleellisesti naudaninsuliiniton, lehmänmaidosta peräisin oleva rasvaton proteiinipitoinen materiaali, kuten hera, rasvaton maito tai kaseininiliuos, edullisesti hera.

25. Menetelmä oleellisesti insuliinittomän äidin-maidonkorvikkeen tai jonkin muun erityisravintovalmisteen tai kulutusmaidon tai sen raaka-aineen valmistamiseksi, tunnettu siitä, että tuotteen valmistuksessa proteiiniosana käytetään patenttivaatimuksen 1 mukaista tai jonkin patenttivaatimuksista 2 - 9 mukaisesti valmistettua proteiinikoostumusta.

Kuva 1:

IgG-luokan vasta-ainetaso naudan insuliinia kohtaan 6 kuukauden ikäisillä lapsilla, jotka ovat saaneet pelkästään rintamaitoa tai lisäruokintana tavallista äidinmaitokorviketta (Enfamil®)

